Contribuição para o estudo da biolojia dos culicidas.

Observações sobre a respiração nas larvas

pelo

Dr. A. da Costa Lima.

(Com 3 figuras no texto.

No numero de Janeiro de 1915 do "The Indian Journal of Medical Research" veiu um artigo do Snr. S. K. SEN sobre a respiração dos culicidas. Em um *addendum* ao citado artigo o autor faz algumas considerações a respeito do meu trabalho: "*Observations on the respiratory process of mosquito larvae*" que fora anteriormente publicado nestas Memorias (Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. VI, 1, 1914. pj. 18)

Criticando o dispositivo que empreguei (Fig. 1) para conservar as larvas sem respirar o ar livre, o autor faz algumas considerações a respeito das bolhas de ar que, ás vezes, apareciam em minhas experiencias. Quando tal acontecia eu dava a experiencia como interrompida e, depois de retiral-as, recomeçava a contar o tempo, tratando-se assim de nova experiencia. O aparecimento de taes bolhas era devido ao seguinte fato: eu enchia os dois vasos, quer o externo, quer o interno, com agua bem arejada da torneira do encanamento e deixava o dispositivo ficar em um lugar em que a temperatura do ambiente era, ás vezes, relativamente elevada; nestas condições, uma parte do ar, que se achava em dissolução, desprendia-se da agua e vinha formar pequenas bolhas sob a placa obturadora do frasco interno.

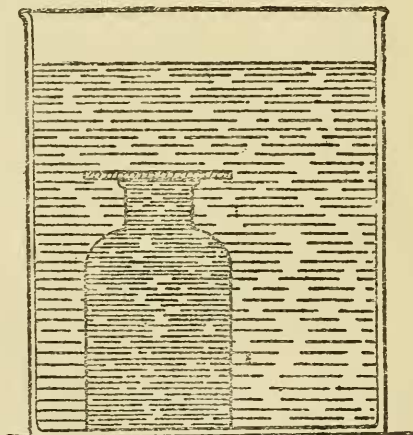



Fig 1.

O autor diz mais, que fiz apenas uma experiencia empregando agua fervida, para mostrar como as larvas pouco tempo duram nesse meio, entretanto em meu trabalho ha duas experiencias em que empreguei agua recentemente fervida.

Ele acha tambem que o efeito da remo-

ção dos foliolos foi seguido de resultados muito discordantes, nas 6 larvas observadas. Os resultados que o Snr. SEN taxa de discordantes indicam claramente que a larva, mesmo privada dos foliolos branquiaes, ainda vive durante algum tempo debaixo dagua; tal fato só pode ser explicado pelas trocas gazosas atravez do tegumento da larva. Por outro lado, larvas com os foliolos branquiaes demoram muito mais tempo, mostrando assim o papel importante que desempenham esses organs na respiração das larvas. Si o Snr. SEN tivesse feito a ablação dos foliolos de uma larva, como a de *Limatus Durhami* THEOB., isto é, dotada de foliolos que apresentam abundante ramificação traqueal, o que permite, mesmo em normaes condições de existencia, manter-se a larva durante muito tempo sem vir á tona dagua, certamente não diria que a eliminação dos foliolos parece não ter senão pequeno efeito sobre a respiração larvaria.

A terceira objeção feita pelo Snr. SEN é de todas a mais extranha; é ela a seguinte:

> "Thirdly, the introduction of food might possibly have brought in air particles entangled in the stuff, and if the food was principally vegetable it must presumably have evolved oxygen in confinement and may thereby have kept the larvae alive."

Ainda não pude verificar em que trecho do meu trabalho do Snr. SEN foi descobrir que eu introduzia alimento para as larvas. Talvez ele tenha chegado a essa conclusão pela leitura do trecho em que eu digo:

> "Small larvae having enough food in the vessel used for the experiment, etc, etc."

É evidente que eu dizendo *"enough food for the small larvae"* em uma agua limpa e arejada, refiro-me simplesmente á flora e á fauna microscopicas que sempre existem em qualquer agua potavel. Assim, eu não me referi á introdução de particulas de materia organica na agua das minhas experiencias, cousa que nunca fiz, mesmo porque, si o fizesse, teria como resultado a morte das larvas que estivessem nesse meio, muito antes de outras que estivessem em condições identicas, porem vivendo em agua limpa; a morte das primeiras seria devida ao gaz carbonico desprendido pela materia organica, logo que esta entrasse em decomposição.

Ele diz mais:

> "Fourthly, when the water was being changed, was sufficient precaution taken to prevent the formation of air bubbles which often occur as a consequence of general agitation of the water?".

A simples inspeção do meu dispositivo (Fig. 2) para o renovamento da agua

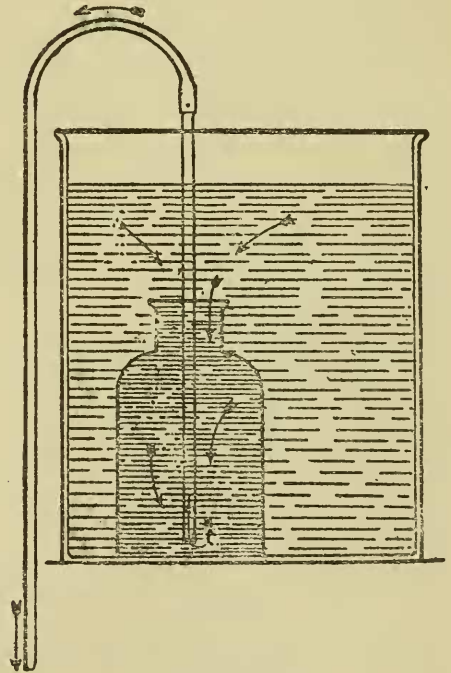



Fig. 2.

prova que essa objeção não tem a menor razão de ser. A agua, saindo devagar, por sifonajem, do vaso interno, era lentamente substituida pela que se achava, desde o dia anterior, no vaso externo; nestas condições, como poderia haver a formação de bolhas

de ar, uma vez que não se produzia a menor ajitação da agua.

Finalmente o Snr. SEN descreve e figura um dispositivo pelo qual ele verificou que as larvas, mergulhadas, raramente viviam mais de 7 horas.

Embora ele não dê as dimensões do tubo em que colocava as larvas, vê-se, no desenho, pela comparação das dimensões da larva com as do tubo, que devia ter este mais ou menos uns 9 centimetros de comprimento por 1 de diametro. Ora, compreende-se que, com um frasco destas dimensões, e talvez com agua pouco arejada ou pouco limpa, ele obtivesse os resultados descritos, uma vez que a agua do vaso externo pouca ou nenhuma influencia podia exercer sobre a larva que estava na agua do tubo.

A duração da vida da larva depende não só da maior ou menor quantidade de agua contida no frasco, em que ela se acha, como tambem da qualidade dessa agua.

Eu acredito que o insucesso das experiencias do Snr. SEN foi em grande parte devido ao emprego de agua pouco arejada, quando eu sempre me utilisei de uma agua clara, sem nela colocar nenhuma particula de materia organica.

A agua potavel do Rio de Janeiro é excelente agua para experiencias, porque é naturalmente pura e bastante arejada.

Não obstante ter certeza absoluta das conclusões, externadas no trabalho anterior, fiz novas experiencias, na presença do Dr. LUTZ, que agora publico e que servem para mais uma vez corroborar o que eu ja dissera; isto é:

As larvas dos culicidas, em normaes condições de existencia, respiram ar livre pelo sifão respiratorio; nem por isso, especialmente nas primeiras fases da evolução, deixam de absorver oxijenio dissolvido n'agua, realisando-se as trocas gazosas principalmente ao nivel dos foliolos branquiaes.

Privadas do ar livre, as larvas podem manter-se vivas durante tempo mais ou menos longo, vivendo então exclusivamente á custa do ar disolvido n'agua.

A duração da vida das larvas sem respirar ar livre varía:

1º *conforme a idade da larva;* as mais novas resistem muito mais que as velhas, prestes a se transformar. 2º *conforme a especie da larva;* as com foliolos de ramificação traqueal abundante resistem mais que as que têm pequeno numero de ramificações traqueaes nos foliolos;

3º *conforme a qualidade da agua em que ela fica mergulhada*; na agua impura, ou recentemente fervida, como tambem em agua impregnada de gaz carbonico elas morrem na maioria muito antes de larvas da mesma idade e procedencia mergulhadas em agua limpa e arejada.

Esperiencias:

Experiencia 1.

12 de Abril. Em um tubo de ensaio, de 15 cm. por 2 cm, introduzi 2 larvas: uma de *Culex cingulatus.* FABR., outra de *Stegomyia calopus* MEIG., (3,5 mm). O tubo foi fechado a tela de arame, conforme fez SEN e mergulhado em cuba, com agua. A' 14 ainda estavam vivas. Morreram a 15 pela manhã.

Experiencia 2.

13 de Abril. Em um tubo de ensaio das mesmas dimensões com agua recentemente fervida introduzi 2 larvas da mesma especie e das mesmas dimensões que as da experiencia nº 1. O tubo, fechado com tela de arame, foi mergulhado numa cuba com agua tambem recentemente fervida, ás 19,50:

Ás 20 horas ambas as larvas vivas.

No dia seguinte, ás 8 horas da manhã, achei as larvas mortas.

Experiencia 3.

12 de Abril. 3 larvas de *Stegomyia* com as seguintes dimensões: 6mm, 5mm e 4,5mm.

A 1º e a ultima foram introduzidas em uma cuba de vidro (0m, 20 de altura por 0,m 15 de diam.) com agua limpa e arejada. Esta cuba foi mergulhada em outra (0,m 40 de altura por 0,m 30 e dim.) contendo agua, ás 20 horas.

Fechei a abertura da cuba interna com uma placa de vidro. A larva de tamanho

medio, colocada na agua da cuba externa, de modo que não foi impedida de respirar o ar livre, transformou-se em ninfa a 15 da qual saiu uma imajem a 19 pela manhã.

As duas larvas que ficaram na cuba interna, respirando unicamente o ar dissolvido nagua, viveram até o dia 22 de Abril.

Experiencia 4.

14 de Abril. Em um capsula de ferro esmaltado, de 2 litros de capacidade, coloquei no fundo: um tubo de ensaio de 1 cent. por 2 cent. e um pedaço de algodão. Enchi-a de agua Levei-a depois ao fogo e deixei a agua ferver durante 4 minutos.

Resfriei depois rapidamente a agua, cercando a capsula com fragmentos de gelo; quando a temperatura da agua contida na capsula abaixou á do ambiente, introduzi no tubo de ensaio uma larva de *C. cingulatus* de 3,mm e uma de *Stegomyia* com 4mm, (19, h 20). Por meio de uma pinça obliterei o tubo de ensaio com o fragmento de algodão.

Ás 20h. morta a larva de *Culex*.

Ás 20h. e 40 morta a larva de *Stegomyia*

Experiencia 5.

14 de Abril. Em um tubo de ensaio de 15 por 2 com agua limpa e arejada introduzi 2 larvas da mesma especie e com as mesmas dimensões das da experiencia precedente. O tubo foi fechado a tela de arame e introdizido ás 20, horas e 5 minutos numa cuba com agua limpa e arejada.

15. A larva de *Culex* vivia pela manhã; encontrada morta ás 12 horas.

18. Ainda vive a larva de *Stegomyia* (noite).

19. As 8 horas encontrei-a morta.

Experiencia 6.

19 de Abril. 3 tubos de ensaio de 15 x 2.

Tubo I. Contendo agua recentemente fervida e 2 larvas de *Stegomyia* (dimensões: 5mm e 3,m 1), fechado a tela de arame e mergulhado em agua tambem recentemente fervida, ás 21 horas.

Tubo II. Contendo agua arejada e 2 larvas de *Stegomyia* (dimensões: 5mm e 4 mm) fechado a tela de arame e mergulhado em agua arejada, ás 21 horas e 5.

Tubo III. Contendo agua filtrada em vela Berkfeld, e 2 larvas de *Stegomyia* (dimensões: 5mm e 3 mm,).

Este tubo não foi mergulhado em agua de sorte que as larvas vinham respirar o ar livre, a tona dagua.

20 de Abril, ás 8 horas, mortas as larvas do tubo I. As dos outros tubos vivas.

22 de Abril, ás 8 horas morta a larva maior do tubo II.

23 de Abril, ás 8 horas morta a larva menor do tubo II.

27 de Abril. Ainda vivem as larvas do tubo III. Estas larvas morreram entre os dias 28 e 30.

Experiencia 7.

18 de Abril. 3 larvas de *Stegomyia* (dimensões; 3,35, 4mm, introduzidas numa cuba de 20 cent 15, com agua bem arejada e esta mergulhada em uma cuba de 40 x 30 com agua arejada, ás 15,45. A cuba interna é fechada com placa de vidro.

Estas larvas viveram bem até principios de Junho sem renovamento da agua da cuba interna. Á 4 de Junho, pela manhã, encontrei 2 larvas mortas.

Á 19 de Junho ainda vivia a outra larva. Nesta data parti para o interior. Voltei a 26, encontrando então a larva morta.

A morte das larvas depois de tanto tempo, talvez fosse mais devida á insuficiencia da alimentação do que á falta de ar.

Experiencia 8.

7 de Julho. Mesmo dispositivo da experiencia anterior; introduzi 1 larva de *Stegomyia*, ás 17 horas.

Esta larva viveu ate o dia 21, sem que tivesse sido feito o renovamento da agua da cuba interna.

A figura 3 representa um novo dispositivo para a observação da respiração aquatica das larvas. Num cilindro de vidro de 11 centimetros de comprimento por 4 de diametro, fechada uma das aberturas com tela de sêda, introduzem-se as larvas e fecha-se depois a outra abertura do mesmo modo. O tubo fica mergulhado numa grande cuba com agua arejada. Com o sifão de vidro e borracha, que se vê desenhado ao lado, pode-se renovar a agua do tubo, bastando para isso encostar a

extremidade do tubo de vidro á tela, que fecha uma das extremidades do cilindro de vidro que contem as larvas e fazer a sifonajem, aspirando a agua.

Experiencia 9.

26 de Julho. Introduzi uma larva de *Stegomyia* com 3 dias de idade, dentro do cilindro de vidro.

Renovamento da agua do cilindro de 2 em 2 dias.

18 de Agosto: Quasi morta.

19. Morta.

Experiencia 10.

8 de Outubro. 3 pequenos tubos de 8 cent. alt. por 3 diametro.

Tubo 1. Agua arejada com uma larva de *C. imitator.* THEO.; uma grande e uma pequena de *C. cingulatus.* Introduzi no tubo um disco de tela de arame de modo a impedir que as larvas viessem á tona da agua. O disco ficou a um centimetro abaixo da supe ficie da agua e esta foi coberta com uma camada de petroleo despejada cuidadosamente pelas paredes do tubo. Nestas condições as larvas não podiam atinjir a camada de petroleo por causa do disco de tela.

de azeite doce na superficie.

Larvas semelhantes ás do tubo I (19 horas pouco mais ou menos).

Tubo III. Agua arejada com uma camada de petroleo na superficie.

Larvas semelhantes ás do tubo I. (19 horas pouco mais ou menos)

Ás 20-35 mortas as larvas grandes dos tubos I e III.

Ás 20-45, morta a larva menor de *C. cingulatus,* no tubo III.

Ás 21-15 No tubo I vivas a larva menor *C. cingulatus* e a de *C. imitator.*

No tubo II. A larva de *C. cingulatus*

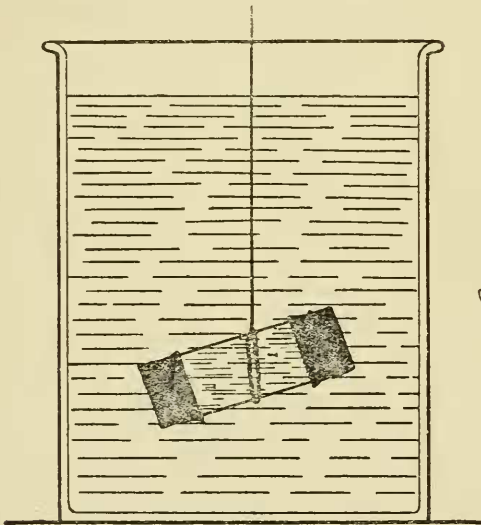
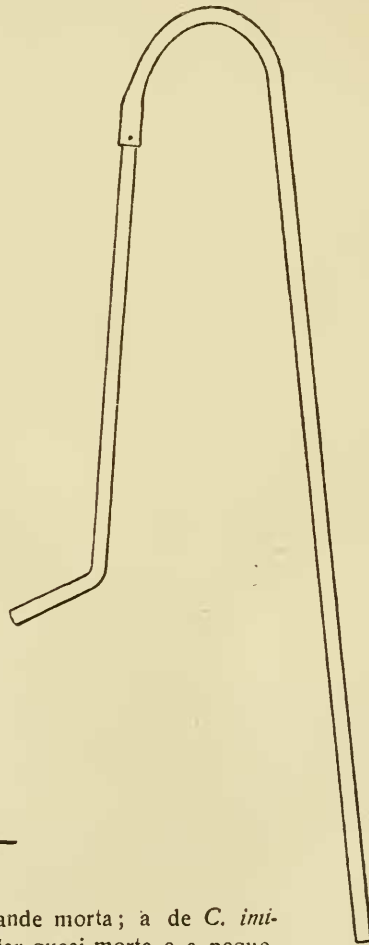



Fig. 3.

As larvas foram introduzidas ás 19 horas.
Tubo II. Agua arejada, com uma camada

grande morta; a de *C. imitator* quasi morta e a peque-

na de *C. cingulatus*, viva.

No tubo III. Todas mortas.

9 de Outubro, 8 horas: Tubo I. vivem ainda as 2 larvas.

Tubo II. Vive ainda o exemplar pequeno de *C. cingulatus*.

A' noite todas mortas.

Experiencia 11.

25 de Outubro. Experiencia realisada com o novo dispositivo.

3 larvas de *Gualteria fluviatilis* LUTZ, introduzidas no cilindro de vidro e mergulhadas em agua arejada, ás 18 horas e 45 minutos. Renovamento da agua de 2 em 2 dias.

27 de Outubro. Umas das larvas pequenas foi devorada pela maior.

12 de Novembro. Morta a larva menor.

16 de Novembro. Ainda vive a larva maior.

17 de Novembro. Encontrei a larva morta.

As larvas de *Mansonia* apresentam na extremidade do sifão 2 pequenos ganchos moveis, que podem ser introduzidos nas partes submersas de plantas aquaticas; uma vez fixado o sifão, a larva aspira o ar dos canaliculos aeriferos, muito desenvolvidos nestas plantas.

(As larvas de *Mansonia titillans* (WALKER) BLANCHARD e de *Mansonia fasciolata* (LYNCH ARRIBALZAGA) DYAR & KNAB, foram descobertas por LUTZ, em aguas contendo plantas flutuantes, ha já muitos anos.

Ele notou que elas, na agua limpa de vejetação, morreram quando não são suportadas perto da superficie. Obteve a metamorfose sustentando as larvas por meio de algodão hidrofilo formando uma camada pouco abaixo da superficie. Mais tarde foi observado por H. W. B. MOORE, na Guiana Ingleza o habito que têm as larvas de *Mansonia titillans* de fixar-se principalmente na *Pistia stratiotes*.

Por experiencias feitas ultimamente verificámos, LUTZ e eu, que a larva de *Mansonia titillans* não pode manter-se exclusivamente á custa do ar dissolvido n'agua. Convem notar que os foliolos branquiaes desta larva apresentam uma ramificação traqueal muito reduzida.

Prendendo larvas de *Mansonia titillans* no cilindro de vidro do meu dispositivo (Fig. 3) verificámos que morrem no fim de poucas horas.

Introduzindo no mesmo tubo alguns exemplares de *Pistia stratiotes*, com larvas de *Mansonia*, elas ficam presas ás folhas e ás raizes e assim se mantêm vivas durante 3 a 4 dias.

Manguinhos, Fevereiro de 1916.